

Oxigén szabad gyökök által mediált változások

a kardiorespiratórikus rendszerben

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Czopf László

Programvezető: Dr. Tóth Kálmán

Pécs

1999

1.1 Bevezetés és az értekezés célkitűzései

A kardiorespiratórikus szervrendszer alapvető funkciója az oxigén felvétele és szállítása.

A légzési és keringési szervek védelme az oxigén valamint reaktív anyagcseretermékei káros hatása ellen különleges fontosságú.

Kezdve az alveolusok felszínét borító lipid-protein réteggel, folytatva a hámsejtmembránokkal, a hámsejtek belső szerkezetével és funkcióival, az intersticiális tér homeosztázisával, a pulmonális endotél működésével, a vér sejteinek működésével és egymásra hatásával, egészen a miokardium izomzatig valamint a kardiális és vaszkuláris endotél működéséig, nyomon követhető a reaktív oxigén intermedierek élettani valamint számos kórfolyamat patogenezisében és patomechanizmusában betöltött szerepe.

Vizsgálataim fő célkitűzései a következők voltak:

1. Tanulmányozni kívántam a hiperoxia által okozott, oxigén szabad gyökök által mediált pulmonális epitel károsodás kivédésének vagy csökkentésének lehetőségét intratracheálisan adott surfactant készítményekkel valamint liposzómához kötött antioxidáns enzimekkel.

2. Humán vizsgálatokkal tisztázni kívántam a koronária szívbetegség valamint hiperlipoproteinémia kapcsán a vaszkuláris rendszert károsító oxigén intermedierek kimutathatóságát és antianginás valamint antilipémiás gyógyszeres kezelés befolyását a vérből kimutatható szabad gyökös folyamatokra, az intra- és extracelluláris antioxidáns rendszerekre.

1.2 Példák az oxigén szabad gyökök által keltett vagy közvetített károsodásokra a kardiorespiratórikus rendszerben:

- a. Hiperoxia, toxinok (pl. paraquat), infekciók, dohányzás és légszennyeződés által keltett pulmonális epitel károsodás,
akut respiratórikus disztressz szindróma,
„sok-szerv-elégtelenséggel” („multi-organ-failure”) járó valamint sokkot követő tüdőkárosodás,
veleszületett respiratórikus disztressz szindróma, bronchopulmonális diszplázia,
primér pulmonális hipertenzió,
autoimmún tüdőbetegségek,
tüdő transzplantátum rejekció, más szerv transzplantátum rejekciója kapcsán keletkező tüdőkárosodás,
sugárzás okozta tüdőkárosodás,
toxikus (pl. bleomicin, paraquat által okozott) valamint idiopátiás tüdőfibrozis,
hypoxiás tüdőkárosodás,
porírtalom valamint azbeszt által okozott tüdőkárosodás,
- b. koronáriszterozis, iszkémia-reperfúziós miokardium károsodás, miokardiális infarktus,
reperfúziós aritmia; antiaritmiás szerek által okozott toxicitás,
a „kábul” és „hibemált” miokardium,
szívműtétnél használt kardioplégia során bekövetkező miokardium károsodás,
paraoxonáz enzim deficiencia kapcsán fokozott kardiovaszkuláris rizikó,
ballonkatéteres tágítást követő koronária resztenózis,
szívtranszplantátum rejekciója kapcsán létrejövő miokardium-károsodás,
egyes kardiomiopátiák és toxikus miokardium léziók: pl. antraciklin antibiotikumok valamint retrovírus ellenes gyógyszerek által okozott dilatatív kardiomiopátia,
- c. a vaszkuláris endotélium, majd a teljes érfa károsodása különböző hatásokra (diabétesz mellitusz, hipertónia, hiperlipoproteinémia), endotél diszfunkció, ateroszklerózis,
vaszkulitiszek.

2.2 Alkalmazott módszerek és vizsgált betegcsoportok

Szubletális hiperoxiás károsodás állatkísérletes modellje: Nyulakat 60 órán át 100%-os oxigén légkörben tartottunk, melynek hatására nem fatális ARDS-hez hasonló állapot alakul ki.

Surfactant fluoreszcens jelölés: 1:500 valamint 1:100 arányban NBD-vel kovalensen összekötött foszfatidilkolint, más esetben 1:780 arányban rodaminnal kovalensen kapcsolt foszfatidilkolint kevertünk a surfactant készítményekhez (EXOSURF, INFASURF vagy CLSE).

Surfactant felületi feszültségének mérése oszcilláló buborékban: A felületi feszültség mérő készülék lehetővé teszi egy felületaktív anyagot is tartalmazó folyadékban kialakított kis légbuborék gáz-folyadék határfelületén létrejött nyomás folyamatos mérését.

Antioxidáns enzimek fluoreszcens jelölése: A Cu,Zn SOD-hez fluoreszcein izotiocianátot kötöttünk (FITC) kovalensen. A szukcinilált katalázhoz (CAT) tetrametilrodamin-izotiocianátot (TRITC) kötöttünk hasonlóképpen.

Antioxidáns enzimek liposzómához kötése: Dipalmitoil foszfatidilkolínból, koleszterinből és sztearilaminból 14:7:4 moláris arányban sokrétegű, kationos liposzómákat állítottunk elő fázisfordításos evaporációs technikával. Ezekhez kötöttük a Cu,Zn SOD-t, valamint a szukcinilált katalázt. Az ilyen liposzómák 1.9 ± 1.5 (S.D.) μm átmérőjűek és több napig stabilak maradnak.

Intratracheális adagolási mód nyulakban: A nyulakat altatás után hossz tengelye körül forgásra képes műtőasztalra rögzítettük úgy, hogy a műtőasztal fej felőli részét megemeltük. A bejuttatandó anyagot vékony katéter segítségével a membrana cricothyreoidea-n keresztül fecskendeztük lassan a tracheába. Az adagolás közben a műtőasztalt 5/perc sebességgel forgattuk az egyenletesebb tüdőbeli eloszlás érdekében.

A fluoreszcensen jelölt surfactant intratracheális beadása: Az előbbi műtéti situációban testtömegkilogrammonként 80 mg (kb. 110 μmol) foszfolipidtartalmú surfactant-et adtunk.

Liposzómához asszociált, fluoreszcensen jelölt antioxidáns enzimek intratracheális beadása: Kb. 20 μmol foszfolipidet tartalmazó liposzómával 2500 E Cu,Zn SOD-t és 1000 E katalázt adtunk be 10 ml foszfáttal pufferolt sóoldatban (pH 7.4). Az így beadott SOD és kataláz aktivitás elérte vagy meghaladta a nyulak tüdejében természetesen jelenlévő összes SOD és kataláz aktivitást.

A nyúl tüdő előkészítése biokémiai vizsgálat, sejtizolálás, surfactant izolálás céljából: A bejuttatást követően más-más időpontban megöltük a nyulakat nátrium pentobarbitál intravénás adásával. A tracheát kanüláltuk, a tüdőt izoláltuk és a pulmonális artérián keresztül hideg foszfáttal pufferolt sóoldattal átmostuk. A tüdőt és a tracheát kivettük a mellkasból, lemértük, és többszöri bronchoalveoláris mosás történt. A bronchoalveoláris folyadék üledékéből történt az alveoláris makrofágok izolálása. A sejtmentes mosófolyadékot használtuk a továbbiakban surfactant izolálásra. A tüdőt felaprítottuk és homogenizáltuk (egyes vizsgálatokban lebenyenként külön). A homogenizátumot lecentrifugáltuk a sejtörmelék eltávolítására, majd a felülúszót -70°C -on tároltuk. Biokémiai analízis előtt a mintákat felolvasztottuk és megkevertük.

A nyúl tüdő előkészítése mikroszkópos vizsgálatok elvégzése céljából: A nyulakat ketamin adásával elaltattuk, a tracheát kanüláltuk, majd az állatokat 100% oxigénnel lélegeztettük. Ezt követően pancuronium intravénás adása után a trachea kanült elzártuk. Miután 5 perc alatt a tüdő abszorpciós atelektázia következtében összeesett, a tüdőt és a szívet pulmonális artérián keresztül történt perfúziót követően eltávolítottuk a mellkasból, a szívet és a mediasztinális kötőszövetet a tüdőről leválasztottuk, 50-80 ml beagyazóanyaggal megtöltöttük, majd -20 fokra hűtöttük. A beagyazóanyaggal töltött tüdők megkeményedése után a lebenyeket különválasztottuk, a lebenyhörgőkre merőlegesen 2-3 mm vastagságú szeletekre vágtuk, ezekből kb. 1 cm^2 területű blokkokat készítettünk, melyeket beagyaztunk, és -80°C -on tároltuk. 5-6 μm vastagságú fagyasztott metszeteket készítettünk.

A FITC-SOD komplexek tüdőbeli stabilitásának vizsgálata: 4 órával a liposzómák bejuttatása után a nyulat megöltük, a tüdőt eltávolítottuk és homogenizáltuk. A homogenizátum felülúszóját besűrítettük Centriprep-10 koncentrátor segítségével és gélkromatográfiát végeztünk. 0.8 ml-nyi frakciókat gyűjtöttünk, melyeket analizáltunk hozzávetőleges fehérjetartalom, Cu,Zn SOD aktivitás és FITC fluoreszcencia szempontjából.

Alveoláris makrofág izolálás: A bronchoalveoláris folyadék centrifugálása során keletkezett üledéket 3 alkalommal reszuszpendáltuk, majd újra lecentrifugáltuk tisztább sejtszuszpenzió elérésére. A vörösvérsejteket 0.83%-os ammóniumklorid oldattal történő inkubálás során oldottuk fel. Az így nyert, nyulanként átlagosan $6-11 \times 10^7$ alveoláris makrofág több mint 95%-ban viabilis tripánké-ekklúzióval vizsgálva.

Alveoláris II. típusú tüdőhámsejt izolálás: Az izolálást tripszin és elasztáz alacsony koncentrációjú oldatával végeztük. A tüdő mellkasból történő kivétele, perfúziója és bronchoalveoláris mosása valamint intratracheális BaSO_4 adás után alacsony koncentrációjú tripszint, elasztáz és dezoxiribonukleáz alkalmaztunk intraalveolárisan. A proteolitikus emésztést 30 perc múlva megállítottuk. A tüdőt felaprítottuk, majd csökkenő pórusméretű nejlon szöveten történő szűrést követően a II. típusú tüdőhámsejteket diszkontinuos sűrűséggrádiens centrifugálással választottuk ki a durva sejtszuszpenzióból. Az így nyert sejtek több mint 85%-a alveoláris II. típusú tüdőhámsejt a lamelláris testeket jelölő festődés, az alkalikus foszfatáz pozitivitás ill. a Papanicolau festés alapján. Tripánké-ekklúzióval a nyulanként átlagosan nyert $2-3 \times 10^8$ sejt több mint 95%-a viabilis.

Az izolált sejtek előkészítése mikroszkópos vizsgálatok elvégzése céljából:

Az alveoláris makrofágokat és II. típusú tüdőhámsejteket különleges centrifuga segítségével üveg tárgylemezre centrifugáltuk és mikroszkóppal megvizsgáltuk.

Mikroszkópos vizsgálatok: A fagyasztott metszeteken és a tüdőhámsejteken differencia interferencia kontraszt és epifluoreszcens mikroszkópia történt Zeiss IM-35 invertált

mikroszkóppal. A képeket CCD kamera rendszerrel összekötött számítógép valamint képfeldolgozó program segítségével értékeltük. Az NBD és FITC vizsgálatához standard FITC szűrőkészletet (485 ± 20 nm excitációs szűrő, 520-560 nm emissziós szűrő), a Rhod-PC és TRITC fluoreszcencia elkülönítéséhez standard TRITC szűrőkészletet (546 ± 10 nm excitációs szűrő, > 590 nm emissziós szűrő) alkalmaztunk. A fluoreszcencia intenzitásokat a metszeten észlelhető autofluoreszcencia mértékével összehasonlítva adtuk meg a háttérfluoreszcencia levonása után. Ez a rendszer alkalmas arra, hogy fluoreszcens festékek eloszlását megítéljük és összehasonlítsuk a különböző alveoláris szegmentumok és sejtek fluoreszcenciájának mértékét.

Tüdőszövet mikroszkópos vizsgálata a fluoreszcens surfactant valamint antioxidáns enzimek eloszlásának megítélésére: Minden metszet egymástól lehetőleg távoli, valószínűségi alapon kiválasztott területeiről legalább 4 felvétel készült. Nagy érkeleteket vagy hörgőket tartalmazó területeket nem értékeltünk. Az alveoláris struktúrákat a differencia interferencia kontraszt mikroszkópos kép alapján manuálisan jelöltük ki, a területre eső pixelek fluoreszcencia intenzitását megmértük és területegységre eső átlagos intenzitást számoltunk. Hasonlóképpen minden képen mértük a háttérfluoreszcencia átlagos intenzitását is a metszetek olyan területén, mely nem tartalmazott tüdőszövetet. A fluoreszcencia intenzitás-különbségeket mesterséges színezéses technikával is megjelöltük.

Surfactant izolálás: A sejtmentes bronchoalveoláris mosófolyadékot tovább centrifugáltuk a foszfolipidek ülepitése céljából, majd az üledéket fiziológias sóoldatban reszuszpendáltuk. A foszfolipidkoncentrációt kloroform - metanol extrakciót követően a foszfátcsoportok mérésével adtuk meg, a surfactant mennyiségét a benne lévő foszfolipid mennyiségével jellemeztük.

Áramlási-citometriai vizsgálat: Izolált sejtek szuszpenzióját egyenes irányú fényszóródás alapján méret szerint, a merőleges irányú fényszóródás alapján belső tagoltság szerint, a fluoreszcencia alapján autofluoreszcencia és különböző jelölések szerint osztályoztuk. Az FITC és NBD fluoreszcencia excitációjára 488 nm hullámhosszú argon ion lézert,

emissziójának detektálására 530 nm feletti áteresztő barrier szűrőt használtunk. Minden mérés előtt kezeletlen alveoláris makrofágok autofluoreszcenciáját is megmértük és a löbbi mérést erre kalibráltuk. A közepes fluoreszcencia intenzitásokat és az autofluoreszcenciát meghaladóan fluoreszkáló sejtek arányát megadtuk az egyes sejtpopulációkban.

Nitrát klinikai vizsgálat: Korábban gyógyszereket nem szedő, más jelentős betegségben nem szenvedő beteget vizsgáltunk (10 férfi, 2 nő), akiknél enyhe típusos stabil angina pectoris miatt elvégzett ergometria során legalább 0.1 mV horizontális vagy deszcendáló ST depresszió lépett fel. Naponta egy alkalommal, reggel 6 órakor monoterápiában 40 mg izoszorbid-5-mononitrátot (Olicard Retard, Solvay Pharma) kaptak. Gyógyszermentesen, majd egy hetes és két hetes nitrát szedést követően történt vérvétel. A betegeknek a megfigyelés időszaka alatt nem léptek fel anginás panaszai. Más gyógyszert a megfigyelési periódus alatt nem kaptak, életmódjuk sem változott meg lényegesen.

Lovasztatin vizsgálat: 7 hiperkoleszterinémiás beteget vizsgáltunk meg (3 nő és 4 férfi), akiknél két hónapos koleszterinszegény diéta nem okozott jelentős javulást az éhgyomri koleszterinszintben. A betegek korábban lipidcsökkentő kezelést nem kaptak. Szokásos antihipertenzív és acetilszalicilsav kezelés megengedett volt, de ezt egy hónappal a vizsgálat megkezdése előtt stabilizáltuk, és a vizsgálatot megelőző időszakban valamint a vizsgálat 3 hónapja alatt nem változtattuk meg. A betegek napi 20 mg lovasztatint (Mevacor, MSD) vettek be az esti étkezést követően. Alap vérvétel történt a gyógyszereszedés megkezdése előtt, majd egy, két és három hónap múlva.

A szuperoxid dizmutáz aktivitás meghatározása a xantin - xantin oxidáz rendszerben termelt szuperoxid gyök által okozott citokró-m-c redukció gátlása alapján, spektrofotometriásan történt. A Cu,Zn SOD valamint a Mn SOD elkülönítése a Cu,Zn SOD KCN-dal történő gátlása alapján volt lehetséges. A vérből történt méréseknél az adrenalin autooxidációján alapuló módszert használtuk.

A fehérijemeghatározás általában Bradford módszerével történt, a tüdőből visszanyert fehérjék gélkromatográfiás analízise során a fehérjekoncentrációt az aromás aminosavak oldalláncai által okozott ultraibolya fényelnyelés alapján becsültük (280 nm hullámhosszon).

A kataláz aktivitás meghatározása spektrofotometriásan, a hidrogénperoxid koncentrációjának csökkenéséből (fotometrálas 240 nm-en) történt.

A glutation peroxidáz aktivitást Matkovics módszere alapján,

a redukált és oxidált glutation meghatározását a módosított Tietze módszerrel végeztük.

A malondialdehid koncentrációjával jellemeztük a lipid peroxidációt és a tiobarbitursavval való reakciójának 532 nm-en való fotometrálásával mértük.

A neutrofil granulocita izolálás diszkontinuus sűrűséggrádiens centrifugálással történt nátrium citráttal alvadásgátolt vérből.

Neutrofil granulociták stimulált szuperoxid anion képzésének mérése: A sejteket forbolészter alkalmazásával aktiváltuk és citokró-m-c redukciójának követésével mértük a keletkező szuperoxid anion koncentrációját.

2.3 Eredmények

2.3.1 Pulmonális oxigén toxicitás kivédésének lehetősége intratracheális surfactant készítmények adásával

A tüdő hiperoxiás károsodásának jelentős tényezője a pulmonális surfactant funkcióvesztése. Kísérleteim első csoportjában a károsodott tüdő surfactant exogén pótlásának lehetőségét vizsgáltam meg nyulakon. Fluoreszcensen jelölt surfactant készítmények (CLSE és EXOSURF) használatával vizsgáltam a mikroszkópikus, intraalveoláris eloszlást a kísérleti állatok tüdejében. Nemcsak a terápiás hatássóságot, de a bejuttatás eredményességét is befolyásolja az egyes surfactant készítmények felületi feszültsége.

Pulzáló buborék elven működő felületi feszültség mérővel vizsgáltam fluoreszcensen jelölt lipidekkel összekevert surfactant készítmények felületi feszültségének viselkedését. A jelölt és jelöletlen CLSE (borjú tüdőből nyert természetes surfactant) (5 mg/ml) 2 percen belül 2 mN/m alatti minimális felületi feszültséget ért el dinamikus kompresszió során, az EXOSURF (szintetikus surfactant) azonos koncentrációja jelölt és jelöletlen formában egyaránt 30 mN/m-es érték feletti minimális felületi feszültséget produkált. Fizikai tulajdonságok szempontjából tehát nem különböztek lényegesen a fluoreszcensen jelölt és a jelöletlen surfactant készítmények. B és C típusú surfactant apoproteinek hozzáadása hatására az EXOSURF is elérte 3 perc alatt a 2 mN/m alatti minimális felületi feszültséget jelölt és jelöletlen formában egyaránt. Ez egyrészt aláhúzza a surfactant lipídoldékony apoproteinjeinek jelentőségét a surfactant fizikai felületaktív tulajdonságának kialakításában, másrészt bizonyítja, hogy a lényegesen nagyobb méretű és polaritásában, oldékonysági tulajdonságaiban is eltérő fluoreszcens lipid az alkalmazott koncentrációkban nem rontja a surfactant alapvető fizikai tulajdonságait valamint nagy valószínűséggel nem befolyásolja hátrányosan a levegő-folyadék határfelületen történő terjedését.

További vizsgálataimban altatás során, tracheosztómián keresztül, oldat formájában történő beadás módszerét tanulmányoztam egészséges és hiperoxia által károsított tüdejű nyulakban. A beadás a teljes tüdőkapacitás 10%-át nem meghaladó folyadékmennyiségben, hossz tengelye körül forgó műtőasztalon történt az eloszlás hatásfokának javítása céljából. A fluoreszcensen jelölt surfactant készítmények bejuttatásának hatásosságát vizsgáltam a beadás után 2, 4 és 24 órával frissen izolált II. típusú tüdőhámsejtek áramlási-citometriás analízisével és videó-mikroszkópiával. Kvantitatív fluoreszcens mikroszkópiával a beadott surfactant jelenlétének megfelelő fluoreszcencia kimutatható volt a bronchusokban és az alveolusokban. Jelentős változékonyságot tapasztaltam azonban a fluoreszcencia intenzitásában a szomszédos alveolusok között valamint egyetlen alveolus különböző felszínei között. Áramlási-citometriás analízis jelentős változékonyságot mutatott beadást követően 2, 4 valamint 24 óra múlva frissen izolált II. típusú pulmonális epitel sejtek fluoreszcencia intenzitásában. Az autofluoreszcenciát meghaladóan fluoreszkáló alveoláris makrofágok aránya 2 órával a beadást követően 63% volt EXOSURF esetében. Az autofluoreszcenciát meghaladó mértékben fluoreszkáló II. típusú tüdőhámsejtek aránya 56% volt. A hiperoxiának kitett nyulak tüdejében nem volt lényegesen kevesebb a fluoreszkáló makrofágok aránya, a bejuttatott, jelölt surfactant-et felvevő tüdőhámsejtek aránya sem változott. Ezekből a jelenségekből az oldat formájában intratracheálisan beadott surfactant készítmények egyetlen alveoláris eloszlására következtettem, mind normális levegőn tartott, mind hiperoxiának kitett állatokban.

2.3.2 Pulmonális oxigén toxicitás kivédésének lehetősége intratracheálisan adott, liposzómához asszociált antioxidáns enzimekkel

Ebben a kísérletsorozatban a pulmonális oxigén toxicitás által okozott epitélkárosodás kivédésének lehetőségét tanulmányoztam kívülről bejuttatott antioxidáns enzimekkel. A liposzómához asszociált bejuttatási mód hatásosságát valamint a terápiás hatás mechanizmusát kívántam megvizsgálni celluláris valamint alveoláris szinten. Az intratracheálisan történő beadást követően 2, 4, 8, 24, 48 vagy 72 órával az állatokat megöltük és részben szövethomogenizátumot állítottam elő biokémiai analízis céljából,

részben pedig II. típusú tüdőhámsejteket izoláltam valamint fagyasztott metszeteket készítettem. A tüdőlebenyek között nem találtunk lényeges különbséget a fehérjemennyiségre vonatkoztatott enzimaktivitásokban. A tüdőszövet szuperoxid dizmutáz enzim aktivitása legnagyobb volt a beadást követően 4 órával, majd csökkent, és újabb 4 óra múlva a kiindulási érték közelébe tért vissza. A Mn-SOD aktivitás az elvárásnak megfelelően nem változott. A tüdőszövet kataláz aktivitása még 24 óra múlva is szignifikánsan meghaladta a kiindulási értéket. Az egyes tüdőrészekben meghatározott enzimaktivitásértékek ugyanezt a kinetikát követték. A fagyasztott metszetek kvantitativ fluoreszcens mikroszkópos vizsgálata során emelkedett fluoreszcencia intenzitásokat regisztráltam az alveolusokban az autofluoreszcenciához képest, de a fluoreszcencia eloszlása alveoláris szinten egyenetlen volt egy alveoluson belül is valamint a szomszédos alveolusok között. Az üres liposzómákkal kezelt tüdőrészek fluoreszcenciája megegyezett a kezeletlen tüdő autofluoreszcenciájával. A II. típusú tüdőhámsejtek SOD aktivitása a szövetekhez hasonlóan növekvő tendenciájú volt, de szignifikáns fokozódást nem figyeltünk meg (Cu,Zn SOD: 10.5 E/mg fehérje a kontroll 5.5 E/mg fehérje értékéhez képest). A Mn szuperoxid dizmutáz aktivitás nem változott. A II. típusú tüdőhámsejtek kataláz aktivitása a kontrollhoz képest jelentősen magasabb volt 4 órával a beadást követően (CAT: 6.7 E/mg fehérje a kontroll 5 E/mg fehérje értékéhez képest). 24 óra múlva a kataláz aktivitás még mindig szignifikánsan emelkedett volt. Abban, hogy az intratracheális injekciót követően izolált alveoláris II. típusú tüdőhámsejtek SOD aktivitása összességében nem nőtt szignifikánsan, részben az egyenetlen eloszlás, részben pedig az alveoláris makrofágokba történő felvétel játszhatott szerepet.

A bejuttatás és a fluoreszcens jelölés hatásosságát kívántam vizsgálni a szövetekből 4 óra múlva visszanyert fehérjék gélikromatográfiás analizisével. 4 órával a beadást követően a szövetekből izolált FITC fluoreszcenciával rendelkező fehérjefrakció azonos volt a Cu,Zn SOD aktivitást mutató frakcióval. A kromatográfia során talált másik fluoreszkáló fehérjefrakció minden bizonnyal megfelel a tüdőben található autofluoreszkáló fehérjé(k)nek, mivel kívülről bevitt fluoreszcens anyaggal nem kezelt tüdőben is megtalálható ez a fluoreszcencia. A tüdőszövet ultrafiltrátuma nem tartalmazott jelentős fluoreszcenciát.

A jelöletlen szuperoxid dizmutáz nem rendelkezik jelentős autofluoreszcenciával. Ebből arra következtettem, hogy a fluoreszcens festék és az enzim legnagyobb része kötésben marad órákkal a beadást követően a tüdőben is.

2.3.3 Farmakológiai hatások befolyása az oxigén szabad gyök mediálta folyamatokra iszkémiás szívbetegekben (klinikai vizsgálatok):

Ezekben a vizsgálatokban megpróbáltam követni az iszkémiás szívbetegség során észlelhető és a vérből kimutatható szabad gyökös reakciók módosulásait farmakológiai hatásokra.

2.3.3.1 Per os lovasztatin kezelés tartós hatását vizsgáltam meg a szabad gyökös reakciókra iszkémiás szívbetegekben. Napi 20 mg lovasztatin 3 hónapos kezelés során jelentősen mérsékelte az összkoleszterinszintet (a kezdeti 7 mmol/l körüli értékről egy hónapon belül 5 mmol/l-re csökkent ($p < 0.01$), és ezen a szinten stabilizálódott), csökkentette a kiindulási emelkedett szuperoxid anion termelést a neutrofil granulocitákban kb. 50%-kal (28 ± 8 -ról 13 ± 5 nmol/1.5 millió sejt/perc, $p < 0.01$), a magas malondialdehid szint a normális szintre csökkent a vörösvérsejtekben (550 ± 30 -ról 430 ± 25 nmol/ml hemolizátumra, $p < 0.05$). A vörösvérsejtek SOD és kataláz aktivitása nem változott. A glutation peroxidáz aktivitás szignifikáns módon megemelkedett (13.92 ± 0.57 -ről 17.36 ± 1.44 U/ml-re, $p < 0.05$). A vörösvérsejtek redukált glutation tartalma átmenetileg növekedett, aminek hátterében az összglutation mennyiség növekedése állhat, mert az oxidált glutation mennyisége lényegesen nem változott. A plazma redukált glutation mennyisége szintén emelkedett.

2.3.3.2 Exogén nitrát hatását vizsgáltam meg a szabad gyökös fiziológiás és patológiás folyamatokra iszkémiás szívbetegekben. 40 mg izoszorbít-5-mononitrát 2 hét alatt kifejtett hatását vizsgáltam meg iszkémiás szívbetegekben a neutrofil granulociták stimulált szuperoxid gyök termelésére, az endogén celluláris és plazma enzimatis és non-enzimatis scavenger mechanizmusokra és a lipid peroxidációra valamint a reológiai paraméterekre. A neutrofil granulociták alaphelyzetben emelkedett szuperoxid anion képzése a nitrátadás során szignifikánsan nem változott, a vörösvérsejtek szuperoxid dizmutáz aktivitása kezdeti magas értékről lényegesen csökkent. A vörösvérsejtek valamint a plazma malondialdehid koncentrációja nem változott egyértelműen, bár a plazma malondialdehid a 2. hétre kissé csökkent: 0.72 ± 0.07 -ről 0.59 ± 0.08 nmol/ml-re ($p < 0.05$). A vörösvérsejtek glutation peroxidáz aktivitása növekedett. A vörösvérsejtek kataláz aktivitása nem változott. A nagy mennyiségű redukált glutation a vörösvérsejtekben nem szignifikáns csökkenő tendenciát mutatott a két hetes kezelés alatt, a nagy mennyiségű oxidált glutation jelentősen csökkent. Napi 40 mg izoszorbít-5-mononitrát nem változtatta meg lényegesen sem a teljes vér és plazma viszkozitást, sem a trombocita aggregációt.

2.4 Következtetések

1. A pulmonális oxigén toxicitás egyik terápiás lehetősége az intratracheálisan adott surfactant. A hatás szempontjából in vivo az EXOSURF is a CLSE-vel megegyezően működik.
2. Az általam alkalmazott fluoreszcens jelölés nem befolyásolja lényegesen a surfactant-ek fizikai tulajdonságait.
3. A surfactant eredményesen juttatható be a tracheán keresztül a tüdőbe, de mind alveoláris, mind celluláris szinten egyenetlen az eloszlása.
4. Liposzómához kötöten antioxidáns enzimek juttathatók az alveolusokba és a tüdőszövet sejtjeibe. Ezek jelentősen megemelik a lokális antioxidáns védelmet.
5. A liposzómához kötött antioxidáns enzimek 4 óra múlva visszanyerhetők a szövetekből és aktivitásuk is megmarad.
6. A FITC-vel kovalens módon fluoreszcensen megjelölt antioxidáns enzimek jelölése a szöveti transzportjuk során is stabilan kötve marad (legalább 4 óra hosszat).
7. Lovasztatin krónikus kezelés során iszkémiás szívbetegekben csökkentette a neutrofil granulociták stimulált szuperoxid gyök képzését és minden bizonnyal a membránok lipid peroxidációját. A lovasztatin ilyen jellegű hatása valószínűleg nem szuperoxid dizmutáz enzim aktivitás fokozáson keresztül valósul meg.

8. A glutation mennyiségének fokozódása valamint a glutation peroxidáz enzim aktivitásának fokozódása lovasztatin kezelés során hidrogénperoxid termeléssel kapcsolatos kompenzációs mechanizmus következménye lehet.

9. A per os nitrát kezelés mérhető, de a lovasztatin kezeléshez képest mérsékeltebb változásokat idéz elő a vérből kimutatható szabad gyökös folyamatokban. Kis mértékben, de egyértelműen csökkenti a vörösvérsejtek szuperoxid dizmutáz aktivitását.

10. A szabad gyökös reakciók hatásainak követése, a kompenzációs mechanizmusok aktivitásának monitorozása fontos eszköz lehet a kardiorespiratórikus rendszer patofiziológiájának mélyebb megértésében, a farmakológiai hatások hátterének és a betegségek prognosztikus tényezőinek feltárásában.

A témához kapcsolódó saját közlemények

1. Baker, R. R., L. Czopf, T. Jilling, B. A. Freeman, K. L. Kirk, S. Matalon: Quantitation of alveolar distribution of liposome-entrapped antioxidant enzymes. Am. J. Physiol. 263: L585-594, 1992.
2. Czopf, L., R. R. Baker, T. Jilling, B. A. Freeman, K. L. Kirk, S. Matalon: Liposome entrapped antioxidant enzyme delivery to the alveoli of the lung. In: Mózsik Gy. (Ed.) Role of Free Radicals in Biological Systems. Topics 1993. Akadémiai Kiadó, Budapest.
3. Pataki, G., L. Czopf, B. A. Holm, S. Matalon: Quantification of the alveolar distribution of surfactant mixtures in normal and injured lungs. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 15: 451-459, 1996.
4. Czopf, L., C. T. Myles, S. Matalon: Fluorescent labelling does not affect the minimum surface tension of surfactant mixtures. (abstract) The FASEB Journal, Abstracts, 6: A1269, 1992.
5. Czopf, L., Gy. Pataki, B. A. Holm and S. Matalon: Quantification of alveolar distribution of intratracheally instilled surfactant mixtures. (abstract) The FASEB Journal, Abstracts 7: A499, 1993.
6. Tóth, K., T. Habon, L. Czopf, D. Endrei, I. Juricskay, Gy. Mózsik: The hemorheologic and hemodynamic effects of Olicard Retard (isosorbide-5-mononitrate) in patients with ischemic heart disease. (abstract) Clin. Hemorheol., 15: 474, 1995.

7. Czopf, L., K. Tóth, T. Habon, D. Endrei, Gy. Mózsik, E. Róth: The effect of isosorbide-5-mononitrate on the production and metabolism of reactive oxygen species and rheological parameters in patients with ischemic heart disease. (abstract) Clin Hemorheol., 15: 475, 1995.
8. Czopf, L., K. Tóth, T. Habon, R. Halmosi, E. Róth: The effect of lovastatin on the production and metabolism of reactive oxygen species and on haemorheological parameters in patients with hyperlipoproteinemia. (abstract) Third International Congress of the Worldwide Hungarian Medical Academy. Pécs, Hungary, July 4-6, 1996.
9. Czopf, L., K. Tóth, D. Endrei, R. Halmosi, E. Róth: Nitrate and lovastatin treatment influences the metabolism of reactive oxygen species in patients with ischemic heart disease. (abstract) First International Symposium on Myocardial Cytoprotection. Pécs, Hungary, September 26-28, 1996. Cardiologia Hungarica, Suppl. 1997/2, p. 44.
10. Czopf, L., J. Nemes, J. Varga, J. Lantos, E. Róth: The values of detection of free radical mediated reactions in patients. Acta Chirurgica Hungarica, 36: 65-66, 1997.
11. Lantos J., E. Róth, L. Czopf, J. Nemes, I. Gál: Monitoring of plasma total antioxidant status in different diseases. Acta Chirurgica Hungarica, 36: 188-189, 1997.
12. Halmosi R., L. Czopf, G. Késmárky, T. Habon, K. Tóth, I. Juricskay, E. Róth, J. Lantos, Gy. Mózsik: The effect of lovastatin and nitrate on free radical mediated processes in patients with ischemic heart disease. 2nd International Symposium on Myocardial Cytoprotection, October 8-10, 1998, Pécs, Hungary. Abstract book.
13. Lantos J., E. Róth, R. Szokodi, L. Czopf, G. Késmárky, K. Tóth, R. Halmosi, J. Nemes: Plasma antioxidant status in cardiac diseases. 2nd International Symposium on Myocardial Cytoprotection, October 8-10, 1998, Pécs, Hungary. Abstract book.

14. Czopf, L., R. Halmosi, G. Késmárky, T. Habon, K. Tóth, I. Juricskay, E. Róth, Gy. Mózsik: Lovastatin and nitrate therapy induced changes in hemorheological parameters and in free radical mediated processes in patients with ischemic heart disease. Perfusion, 12: 50-58, 1999.
15. Halmosi R., Czopf, L., Késmárky G., Habon T., Tóth K., Juricskay I., Róth E., Mózsik Gy.: Hemorheologiai paraméterek és szabad gyökös folyamatok változása ischaemiás szívbetegekben nitrát illetve lovastatin kezelés hatására. Cardiologia Hungarica, 1999. (nyomdában).